

【产品概述】

本试剂盒使用精心配制的溶胶&结合缓冲液结合经典的离心吸附柱纯化法，可以快速、高效地从 PCR 产物或琼脂糖凝胶中回收 100 bp-15 kb 的 DNA 片段。在特定缓冲条件下，DNA 被吸附在离心柱的硅基质膜上，经过洗涤步骤去除杂质后，进一步洗脱得到高纯度的 DNA。纯化得到的 DNA 可用于酶切、连接、测序等后续分子生物学试验。

【产品组分】

组 分	M1PG02-01 (50 次)	M1PG02-02 (200 次)
平衡液	25 mL	100 mL
溶液 I	25 mL	100 mL
溶液 II*	12 mL*	48 mL*
溶液 III	8 mL	30 mL
DNA 纯化柱及收集管	50 套	200 套

*首次使用时，按照说明书及瓶身提示在溶液 II 瓶中加入指定体积的无水乙醇：在 M1PG02-01 加入 48 mL 无水乙醇；在 M1PG02-02 加入 192 mL 无水乙醇。

【储存和运输】

试剂盒常温运输，室温保存（15-25℃）；产品有效期 1 年。

【注意事项】

- 自备无水乙醇、异丙醇（小片段回收）等试剂，以及水浴锅/金属浴、离心管等设备及耗材。
- 平衡液处理可以改善纯化柱吸附能力；使用前检查平衡液是否出现浑浊，如有浑浊，可水浴加热。
- 溶液 I 有一定刺激性，操作过程应注意采取适当的防护措施，如穿戴工作服、手套、护目镜等。
- 首次使用前在溶液 II 中加入指定体积的无水乙醇，充分混匀并在瓶上做好标记。
- 可以使用去离子水、Low TE 或 TE 溶液代替溶液 III 进行洗脱，使用去离子水时其 pH 不应低于 7。
- 试剂盒对小于 200 bp 或大于 10 kb 的 DNA 片段的回收率会稍有降低，建议增加 PCR 扩增体积或凝胶电泳时的上样量。



【实验操作】

1. **柱平衡**：将 DNA 纯化柱置于配套收集管中，加入 **500 μ L 平衡液**，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 min，弃收集管中的废液，将纯化柱重新放入收集管。注意：仅在使用前进行 DNA 纯化柱平衡处理。

2. 样本处理：

□ **PCR 产物**：在 50 μ L PCR 产物（若不足 50 μ L，可以使用超纯水补足体积至 50 μ L）中加入 **等体积的溶液 I**，充分混匀。

注意：无色的 PCR 产物溶液 I 混匀后应呈现黄色，如果溶液呈现桔红色或紫色，请使用 3M NaAc pH5.0（自备）将溶液颜色调为黄色再进行后续操作。

注意：对于 <150 bp 或 >10 kb 的片段可加入 **2 倍体积的溶液 I**（如 50 μ L PCR 产物，加 100 μ L 溶液 I）或加入 1 倍体积的异丙醇（即 50 μ L PCR 产物，加 50 μ L 异丙醇和 50 μ L 溶液 I）以提高 DNA 片段回收率。

□ **琼脂糖凝胶**：使用干净、锋利的刀片小心从琼脂糖凝胶中切下含目的片段的胶块（尽量去除不含目的片段的多余凝胶），放入已称重的新的离心管中，再次称重并计算凝胶重量。向离心管中加入 **两倍凝胶体积的溶液 I**（每 100 mg 凝胶视为 100 μ L，需加入 200 μ L 溶液 I），50 $^{\circ}$ C 孵育至凝胶完全溶解。若琼脂糖凝胶浓度较高（比如 2%），可以适当增加溶液 I 的用量。

注意：琼脂糖凝胶完全溶解并混匀后，溶液应呈现黄色，如果溶液呈现桔红色或紫色，请使用 3M NaAc pH5.0（自备）将溶液颜色调为黄色再进行后续操作。

注意：对于 <150 bp 或 >10 kb 的片段可加入 **2 倍体积的溶液 I**（如 100 mg 琼脂糖凝胶，加 200 μ L 溶液 I）或加入 1 倍体积的异丙醇（即 100 mg 琼脂糖凝胶，加 100 μ L 异丙醇和 100 μ L 溶液 I）以提高 DNA 片段回收率。

3. 转移上一步溶液至平衡处理后的 **DNA 纯化柱**中，室温放 **2 min**，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 min，弃收集管中的废液，将纯化柱放回收集管中。

注意：DNA 纯化柱经平衡处理后，收集管中的废液可能变为紫色，不影响后续操作。

4. 向 DNA 纯化柱中加入 **600 μ L 溶液 II**（确保已经按要求加入指定体积的无水乙醇），12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 1 min，弃收集管中的废液，将纯化柱放回收集管中。

5. 重复步骤 4。

6. 再次 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 2 min，尽量去除溶液 II。将 DNA 纯化柱放入新的 1.5 mL 无核酶离心管中。

注意：尽量去除溶液 II 的残留对于提高 DNA 纯度非常重要。可在室温放置数分钟，彻底晾干，溶液 II 残留可能会降低 A260/A230 的比值，并影响后续的酶切、连接等反应。



7. 向 DNA 纯化柱的柱膜中央滴加 **30 ~ 50 uL 溶液 III**，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 2 min 收集 DNA 溶液。回收的 DNA 溶液可以直接用于下游应用或者 -20°C 保存备用。

注意：将溶液 III 预热到 60°C-70°C，或加入溶液 III 后将纯化柱与离心管置于 65°C 孵育 2min，有助于提高洗脱效率。增加溶液 III 体积有助于提高 DNA 得率，但会降低 DNA 浓度；适当减少洗脱体积（不少于 30 uL）会增加 DNA 浓度，但得率可能会降低。

可选：将离心得到的 DNA 溶液重新加入 DNA 纯化柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400 ×g) 离心 2 min，再次收集 DNA 溶液，可在一定程度上提高洗脱效率。

【常见问题及解决方案】

问题	可能原因	解决方案
产物回收效率较低或者未回收到目的片段	胶块溶解不完全	适当增加水浴时间或增加颠倒次数
	产物浓度较低	纯化前通过琼脂糖凝胶电泳确认产物浓度，增加上样量
	紫外灯下切胶时间长导致部分 DNA 降解	尽量缩短切胶时间
	结合不充分	加入溶液 I 和产物后，充分混匀；增加与纯化柱结合时间
	洗脱时间太短	加入溶液 III 与纯化柱充分结合，延长洗脱时间或 65°C 孵育
	洗脱液不合适	洗脱液的 pH 对洗脱效率有很大影响，若使用超纯水进行洗脱 PH 不得低于 7
	洗涤液使用后未盖紧，乙醇挥发	重新配制 80%乙醇漂洗
	加入异丙醇后变成雾状或产生沉淀	发生盐沉淀，可颠倒混合样品
回收的 PCR 产物进行酶切或者连接效率低	乙醇有残留	将纯化柱晾干后再进行洗脱
	回收产物反复多次冻融，影响后续实验反应	回收后立即进行实验
	目的片段和骨架载体的摩尔比不合适	选择合适摩尔比
	没有足够的 PCR 产物在末端带有 A 附加碱基	保证 PCR 最后 72°C 的 5-10min 延伸时间
琼脂糖凝胶胶块不溶	凝胶体积过大	可用枪头捣碎或切成小块
	琼脂糖质量差	选用高质量琼脂糖
	胶块在空气中放置过久，使胶块干燥失水	切胶后立即回收
	电泳缓冲液浓度过高或者陈旧	配制新鲜缓冲液
回收 DNA 存在多个条带	PCR 产物直接回收，引物特异性差	改为琼脂糖凝胶电泳后切取目的片段进行回收





**SERVE SCIENCE
SEE THE FUTURE**